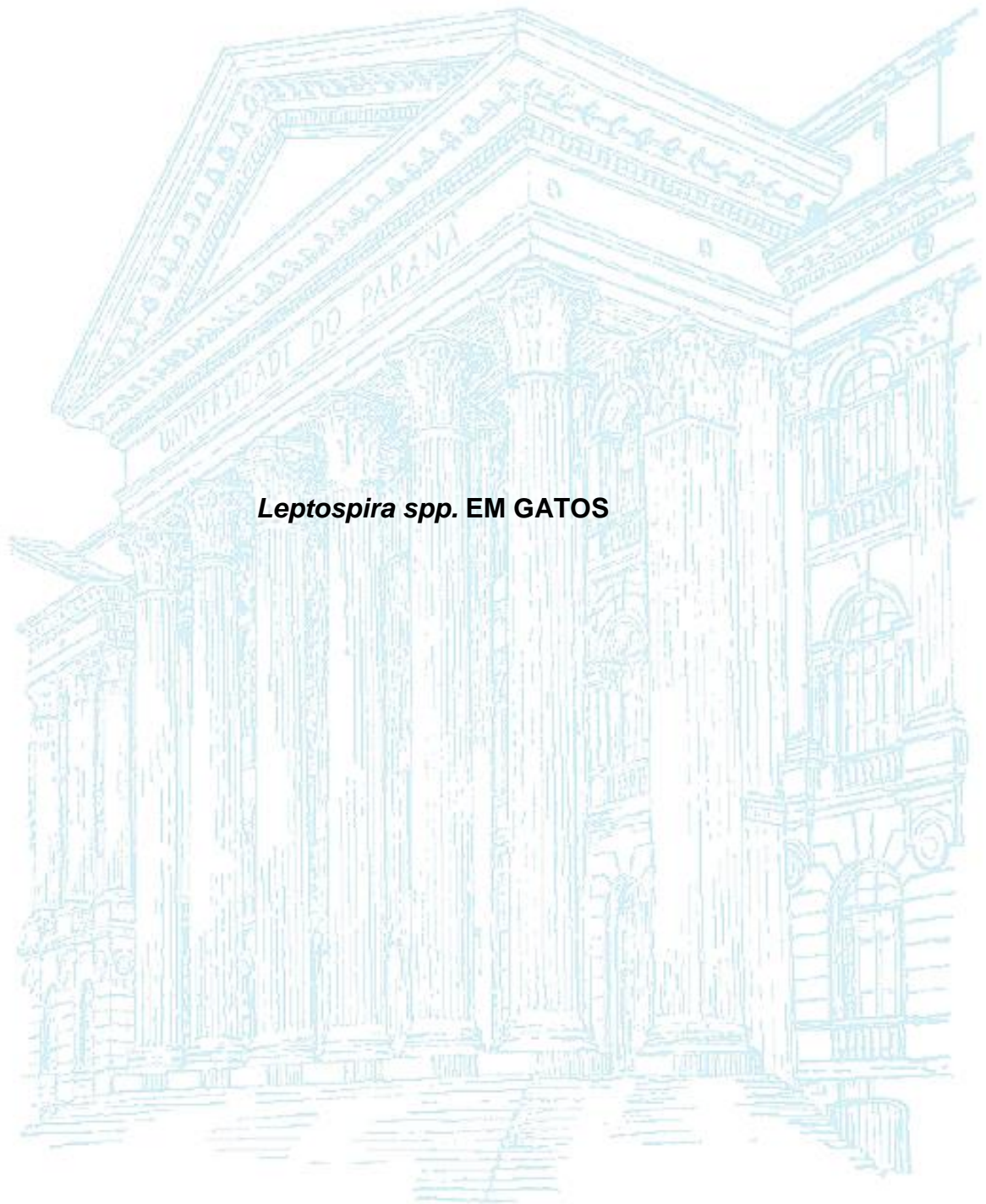


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA TROCHMANN CORDEIRO



***Leptospira* spp. EM GATOS**

CURITIBA

2017

CAROLINA TROCHMANN CORDEIRO

***Leptospira spp.* EM GATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Professora Dra. Simone Tostes de Oliveira Stedile

Coorientador: Professor Dr. Rafael Felipe da Costa Vieira

CURITIBA

2017

C794 Cordeiro, Carolina Trochmann

Leptospira spp. em gatos / Carolina Trochmann Cordeiro. Curitiba: 2017.

44 f.; il.

Orientadora: Simone Tostes de Oliveira Stedile

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.

Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

1. Gato - Doenças. 2. Leptospirose. 3. Zoonoses. 4. Patologia veterinária. I. Stedile, Simone Tostes de Oliveira. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU 599.742.73:619.986.7

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “*Leptospira* spp. **EM GATOS**” apresentada pela Mestranda **CAROLINA TROCHMANN CORDEIRO** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata aprovada para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 15 de fevereiro de 2017

Professora Dra. Simone Tostes de Oliveira Stedile
Presidente/Orientadora

Professora Dra. Vivien Midori Morikawa
Membro

Professora Dra. Rita de Cassia Maria Garcia
Membro

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço muito aos meus pais que acreditaram e deram muita confiança para a criança teimosa e apaixonada que só queria ser “médica de bichinhos”. Meu sonho sempre foi muito forte e isso, com certeza, ainda me ajuda a caminhar mais e mais, mas é na força e carinho de vocês que encontro base firme para dar cada passo à frente. Como diz a vó acho que eu realmente “peguei gosto por estudar”, mas isso só foi possível com a ajuda de vocês.

Obrigada a todos os meus amigos e a meu amor que me animaram quando eu precisei e que me fizeram ver que valia a pena lutar por mais um sonho. Cada palavra de incentivo me fez melhor, me deu paz, me guiou até aqui e vai me fazer continuar. Obrigada pela paciência com a agenda nem sempre tão acessível, com noites perdidas e com o cansaço em alguns dias.

Obrigada aos amigos de jornada que foram aparecendo como anjos na minha vida e que me ajudaram muito psicologicamente e também nas coletas, vocês foram um maravilhoso presente. Obrigada a Rosangela do Centro de diagnóstico Marcos Enrietti pela paciência, simpatia e disponibilidade.

Um muito obrigada muito especial a professora Simone que deixou de ser uma simples orientadora para virar minha segunda mãe e me guiar nessa nova jornada. Obrigada por me fazer “acreditar no invisível” e a ter paciência suficiente para enfrentar o laboratório. Obrigada por sempre me acalmar e me guiar, mesmo quando eu estava totalmente perdida. Obrigada pela sua doçura, carinho, paciência e gentileza no dia a dia e também pela sua amizade. Fiquei muito feliz em ganhar uma orientadora de vida e tenha certeza que você me formou muito na vida e não só na pós-graduação. Você será para sempre um exemplo na minha vida.

Obrigada a todos os professores que passaram pela minha vida e me fizeram me apaixonar por essa profissão tão linda. Vocês serão exemplos vivos dentro da minha mente durante cada aula e palestra que eu proferir.

Obrigada a Universidade Federal do Paraná, minha segunda casa, que me orgulho tanto de fazer parte e que sempre me acolheu tão bem.

Muito Obrigada!

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria”

Paulo Freire

RESUMO

A presente dissertação está dividida em três capítulos. O primeiro é composto de uma revisão bibliográfica que apresenta ao leitor a problemática do gato como portador de leptospiros e sua possível influência na manutenção ambiental do agente. É discutida também a possibilidade de a mesma ser causadora de lesões renais na espécie. O segundo capítulo apresenta 3 métodos para a preservação de *Leptospira* spp. em urina de gato para uma eficiente extração de DNA e amplificação por PCR. E por fim, o terceiro capítulo apresenta estudo realizado com gatos expostos a fatores associados à infecção por leptospiros, provenientes da região metropolitana de Curitiba/PR. Foi objetivo desse estudo detectar leptospiúria por reação em cadeia da polimerase (PCR) e anticorpos contra *L. interrogans* com o uso de soroaglutinação microscópica (SAM). Como conclusão do estudo temos que os mesmos estão suscetíveis a infecção por *Leptospira* spp. e podem apresentar leptospiúria.

Palavras chave: felinos; leptospiúria; saúde pública; zoonose

ABSTRACT

This study was divided into three distinct chapters. The first one is a bibliographic review that presents the cat as a leptospires carrier to the reader and its influence on the environmental maintenance of the agent. The possibility of renal lesions in the specie caused by leptospiral infection is also been discussed. The second chapter introduces three methods to preserve *Leptospira* spp. in cat urine for efficient DNA extraction and PCR amplification. Finally, the third chapter presents a study with cats exposed to infection associated factors in the metropolitan region of Curitiba/PR. The main goal in this study was to detect leptospiuria by polymerase chain reaction (PCR) and antibodies against *L. interrogans* by using microscopic agglutination test (MAT). As a result, we can conclude that cats are susceptible to be contaminated by *Leptospira* spp. and may show leptospiuria.

Key words: cats; leptospiuria; public health; zoonosis

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
REFERÊNCIAS.....	9
1 LEPTOSPIRA SPP. EM GATOS: ESTAMOS SUBESTIMANDO SUA IMPORTÂNCIA?	10
RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	11
LEPTOSPIROSE	12
LEPTOSPIROSE EM GATOS	13
LEPTOSPIRÚRIA EM GATOS	15
FATORES ASSOCIADOS A INFECÇÃO EM GATOS.....	16
CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS.....	18
2 COMPARISON OF THREE METHODS TO PRESERVE LEPTOSPIRA SPP. IN CAT URINE FOR EFFICIENT DNA EXTRACTION AND PCR AMPLIFICATION.	20
ABSTRACT	20
INTRODUCTION.....	21
METHODS	22
Bacterial strain	22
Urine mixed with leptospires	22
Neutralization of urine	22
DNA extraction.....	23
PCR	24
Sensitivity of primer sets	25
Ethical considerations	25
RESULTS	25
DISCUSSION.....	26
CONFLICT OF INTEREST	28
FINANCIAL SUPPORT	28
REFERENCES	28

3 ANTICORPOS ANTI-LEPTOSPIRA SPP.E LEPTOSPIRÚRIA EM GATOS NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA/PR-BRASIL	30
RESUMO	30
ABSTRACT	31
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
Animais	33
Questionários.....	33
Amostras.....	34
Sorologia (SAM)	34
Extração de DNA	35
PCR	36
Sensibilidade dos primers.....	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS.....	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS.....	45
ANEXO 1.....	48

INTRODUÇÃO

A leptospirose é causada por uma bactéria da espécie *Leptospira interrogans*, considerada patogênica dentro do gênero *Leptospira* (Faine *et al.*, 1999). A grande quantidade de espécies capazes de albergar e eliminar a bactéria assegura a persistência do agente no ambiente e também o elevado potencial de infecção (Markovich *et al.*, 2012). Diversas espécies de mamíferos já foram descritas como portadoras e/ou sucessíveis à doença clínica, mas o papel de gatos na epidemiologia da doença, como também a afecção clínica nos mesmos, ainda são pouco descritos e elucidados (Schuller *et al.*, 2015). Isso possivelmente se deve a crença de que gatos eram resistentes a infecção devido à caça de roedores, o que causou um grande atraso nas pesquisas com a espécie. Visando apresentar os estudos realizados com gatos, o primeiro capítulo dessa dissertação apresenta uma revisão bibliográfica sobre o tema. O segundo capítulo apresenta um estudo comparando técnicas para a extração de DNA de amostras de urina de gato visando tornar possível a utilização da técnica *in-house* para pesquisa de leptospirose na espécie. E por fim, o capítulo que segue apresenta estudo realizado com o objetivo de detectar leptospirose por reação em cadeia da polimerase (PCR) e anticorpos contra *L. interrogans* com o uso de soroaglutinação microscópica (SAM) em gatos expostos a fatores associados a infecção na região metropolitana de Curitiba/PR.

REFERÊNCIAS

- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2. ed. [s.l.] MedScience, 1999.
- MARKOVICH, J. E.; ROSS, L.; MCCOBB, E. The prevalence of leptospiral antibodies in free roaming cats in worcester country, Massachusetts. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 2, p. 688–689, 2012.
- SCHULLER, S.; FRANCEY, T.; HARTMANN, K.; HUGONNARD, M.; KOHN, B.; NALLY, J. E.; SYKES, J. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 3, p. 159–179, 2015.

1 *Leptospira* spp. EM GATOS: ESTAMOS SUBESTIMANDO SUA IMPORTÂNCIA?

Leptospira spp. in cats: are we underestimating its importance?

RESUMO

A leptospirose é um problema de saúde pública de importância mundial, afeta grande parte dos mamíferos, incluindo o homem. É uma doença ainda pouco elucidada em gatos e o papel da espécie na epidemiologia da doença é indeterminado. São raros os dados sobre a doença clínica, no entanto, os gatos podem produzir resposta com anticorpos específicos após infecção. Estudos sorológicos demonstram valores de prevalência variando de 5,6 a 33% com descrição de diversos sorovares. Ainda não é possível definir a função exata da leptospira na lesão renal em gatos, porém estudos mais recentes demonstraram possível relação entre leptospiúria e lesões renais agudas ou crônicas. Considerando que a doença renal é de ocorrência comum nos mesmos, a leptospirose pode ser uma causa subdiagnosticada na espécie. Diversos estudos caracterizaram os gatos como possíveis reservatórios da bactéria ao demonstrarem leptospiúria após infecção natural. Entretanto, o risco exato de contaminação de outros mamíferos, incluindo os seres humanos, a partir de gatos infectados ainda é desconhecido. Mais estudos sobre os sorovares envolvidos na infecção, formas de contaminação e de disseminação do patógeno são de grande valia no desenvolvimento de estratégias de controle da doença na população humana e animal. Esses mesmos estudos podem também auxiliar na elucidação da patogenia da bactéria e dar base médica para o tratamento da leptospirose em gatos.

Palavras-chaves: leptospirose; leptospiúria; saúde pública; zoonose

ABSTRACT

Leptospirosis is a public health problem of global significance, affecting mammals, including man. It is a poorly understood disease in cats and their participation in the epidemiology of the disease is undetermined. There are few data of the clinical disease, however, cats can produce specific antibody after infection. Serological studies showed prevalence values ranging from 6.96 to 26.7% and reported several serovars. The exact function of leptospira in kidney damage in cats is still not be defined, but recent studies have shown a possible relationship between leptospiuria and acute or chronic renal injury. Considering the kidney disease a common occurrence in cats, leptospirosis can be a underdiagnosed cause. Several studies have characterized the cats as possible reservoirs of bacteria, by demonstration of leptospiuria after natural infection. However, the exact risk of contamination of other mammals from infected cats, including humans, is unknown. More studies on the serovars involved in the infection, ways of contamination and propagation of the pathogen are of great value in the development of disease control strategies in the human and animal population. These same studies can also help to elucidate the pathogenesis of the bacteria in this species, and give medical basis for the treatment of these patients.

Key words: leptospirosis; leptospiuria; public health; zoonosis

INTRODUÇÃO

A leptospirose é um problema de saúde pública de importância mundial, afeta grande parte dos mamíferos, incluindo o homem (Bharti et al., 2003). A grande quantidade de espécies capazes de albergar e eliminar a bactéria

assegura a persistência do agente no ambiente e também o elevado potencial de infecção (Markovich et al., 2012). É uma doença ainda pouco elucidada em gatos e o papel da espécie na epidemiologia da doença ainda é indeterminado (Arbour et al., 2012).

Por muito tempo foi relatada certa resistência dos gatos à infecção e produção de doença clínica. Ainda não é possível definir a função exata da leptospira na lesão renal em gatos, porém estudos mais recentes demonstraram possível relação entre leptospiúria e lesões renais agudas ou crônicas. Considerando que a doença renal é de ocorrência comum nos mesmos, a leptospirose pode ser uma importante causa subdiagnosticada. (Rodriguez et al., 2014).

A importância dos gatos como transmissores da doença ainda não foi bem elucidada, porém foi possível demonstrar a leptospiúria após infecção natural e com isso caracterizar os gatos também como reservatórios da bactéria (Arbour et al., 2012; Fenimore et al., 2012; Chan et al., 2014; Rodriguez et al., 2014)

LEPTOSPIROSE

A leptospirose é causada por uma bactéria da espécie *Leptospira interrogans* (classificação sorológica), considerada patogênica dentro do gênero *Leptospira*. Além da classificação de espécie, essas bactérias são subdivididas em sorovares. Quando o diagnóstico é sorológico esses organismos podem ainda ser classificados em sorogrupos por semelhanças antigênicas. Essa classificação não é considerada taxonômica, porém é de grande utilidade para o acompanhamento epidemiológico da doença. São descritos mais de 250 sorovares e 29 sorogrupos antigenicamente relacionados (Greene et al., 2012).

A leptospirose considerada uma doença sistêmica em seres humanos e animais, possui uma quantidade variada de sinais, dentre eles: febre, insuficiência renal e hepática, alterações pulmonares e alterações reprodutivas. Muitos casos são subclínicos e geralmente associados a sorovares adaptados ao hospedeiros (André-Fontaine, 2006). Após recuperação da doença clínica alguns animais podem tornar-se portadores assintomáticos, e contaminarem o ambiente por longos períodos com eliminação de leptospiras pela urina. Outros podem ainda se tornar portadores assintomáticos, ou seja, possuem a bactéria em seus rins e a eliminam sem produzir doença clínica, sendo também importante fontes de infecção ambiental (Adler & Moctezuma, 2010).

LEPTOSPIROSE EM GATOS

Por muito tempo acreditou-se que os gatos possuíam certa resistência a infecção, produção de doença clínica ou resposta com anticorpos específicos. Atualmente relatos sobre a doença clínica são raros, mas há diversos estudos sorológicos. Esses demonstram valores de prevalência variando de 5,6 a 33% e diversos sorogrupos são relatados. Em Patos (Brasil) o mais encontrado foi o Pomona, relacionado a infecção em suínos, que na região tem livre acesso a áreas urbanas e rurais e possível contato com os gatos do estudo (Brasil et al., 2014). Em Taiwan (China), região endêmica de leptospirose, o sorogrupo mais encontrado entre os gatos foi o Shermani, na região esse é considerado o mais comum causador de infecção em roedores, bovinos, suínos, cães e humanos (Chan et al., 2014). Em Quebec (Canadá) foi relatada maior ocorrência do sorogrupo presente na infecção de cães e ratos da região, o Bratislava (Lapointe et al., 2013). Em Munique (Alemanha) o sorovar Icterohaemorrhagiae foi o mais

encontrado e correlacionado com a infecção em ratos, sugerindo assim uma possível fonte de infecção para estes gatos (Weis et al., 2016). A diferença na distribuição dos sorogrupos em diferentes regiões pode ser resultado de fatores ambientais e de maior ou menor contato do animal com diferentes espécies animais.

Atualmente alguns relatos de doença clínica em felinos são encontrados na literatura. Em um relato de caso a clínica do paciente foi comparada a clínica subaguda do cão com leptospirose. Nesse, testes sorológicos e de PCR do sangue foram positivos para *L. interrogans*. Após tratamento o paciente demonstrou melhora clínica e soroconversão. Estes autores sugerem que testes para leptospirose devem ser incluídos nos diferenciais para pacientes com possibilidade de contato com o patógeno (Beaudu-Lange & Lange, 2014). Em estudo *pós mortem* de um gato foi possível visualizar em campo escuro espiroquetas no líquido de efusão pleural, humor aquoso e rim. Forte fluorescência foi observada em pulmão, fígado, cérebro e rim para o antígeno Bratislava (Bryson & Ellis, 1976). Em outro relato com a compilação de 3 casos clínicos, os animais apresentaram diferentes estágios de doença renal, com sinais clínicos de poliúria e polidipsia, mas sem nenhum sinal de doença hepática. Dois desses foram tratados após sorologia positiva e apresentaram melhora clínica significativa, o outro foi a óbito e foram realizados exames de PCR da urina e de tecido renal com resultados positivos (Arbour et al., 2012). Há também relato de sinais clínicos de poliúria e polidipsia entre os animais positivos em estudos sorológicos (Lévesque & Serres, 1995; Agunloye & Nash, 1996; Millán et al., 2009; Lapointe et al., 2013). Rodriguez et al., (2014), após observação de diferença significativa entre os resultados sorológicos de um

grupo de gatos com doença renal e outro considerado saudável, sugerem que a infecção por *L. interrogans* pode ser uma causa subdiagnosticada da doença renal aguda ou crônica em gatos. Sugerem ainda que a leptospirose deve ser investigada como uma causa potencial de lesão renal em gatos, especialmente quando há fatores de risco associados. Porém, ainda são necessários ainda mais estudos para determinar o papel do patógeno como causa de doença em gatos (Weis et al., 2016)

LEPTOSPIRÚRIA EM GATOS

Os felinos são cada vez mais frequentes nos domicílios e geralmente possuem estreita relação humano-animal, esses fatos corroboram para um possível aumento no risco de ocorrência de zoonoses no núcleo familiar, principalmente em animais portadores assintomáticos. Apesar da maior resistência da espécie, não se deve ignorar a possibilidade de transmissão, pois é comprovado que após infecção ou doença pode ocorrer eliminação do patógeno na urina (Pol, 2016).

A pesquisa de anticorpos pela técnica de soroaglutinação microscópica é considerada prova padrão ouro pela Organização Mundial de Saúde, porém faz-se necessária a correlação desses resultados com a pesquisa de DNA bacteriano em amostras de urina, para avaliação do estado de portador renal desses animais (Greene et al., 2012; Mittestainer et al., 2015). O papel de gatos saudáveis ou com doença subclínica como hospedeiros reservatórios pode ter sido subestimado no passado, e merece estudos mais aprofundados para determinar o potencial zoonótico destes animais. Diversos estudos demonstraram leptospirose em gatos e com isso os caracterizaram como

reservatórios (Arbour et al., 2012; Fenimore et al., 2012; Chan et al., 2014; Rodriguez et al., 2014). Entretanto, o risco exato de contaminação de outros mamíferos, incluindo os seres humanos, a partir de gatos infectados ainda é desconhecido e tem grande importância na saúde pública (Schuller et al., 2015).

Em inoculação experimental com *L. interrogans*. (sorovar icterohaemorrhagiae e canicola) em gatos, foi observado título de anticorpos durante 8 a 12 semanas e leptospiúria após 2 a 4 semanas da inoculação, com duração de 2 a 8 semanas. Não foram notados sinais clínicos nesses animais (Larsson et al., 1985). Em um estudo realizado com animais semi-domiciliados na Alemanha, foi observada leptospiúria em um gato em duas coletas de urina distintas, com intervalo de 8 meses entre elas, demonstrando possível eliminação contínua da bactéria no meio ambiente. Os autores discutem também a possibilidade de reinfecção devido ao hábito de vida livre (Weis et al., 2016).

FATORES ASSOCIADOS A INFECÇÃO EM GATOS

Dentre os gatos com sorologia positiva e leptospiúria foram observadas mais comumente as seguintes características, consideradas como fatores associados a infecção: semi-domiciliados, caçadores (Brasil et al., 2014), habitantes de áreas urbanas e coabitantes de outro gato (Rodriguez et al., 2014). Foram também encontrados gatos soropositivos e com leptospiúria em um abrigo no Colorado (EUA), levantando a possibilidade de superpopulação como fator de risco (Fenimore et al., 2012). Em gatos com doença clínica foram sugeridos como fatores associados: hábitos de caça (Arbour et al., 2012) e o fato de serem semi-domiciliados (Bryson & Ellis, 1976; Arbour et al., 2012; Beaudu-Lange & Lange, 2014). O fator ambiental foi também relatado ao demonstrar 38

vezes mais chance de soropositividade em gatos que habitavam áreas de produção agrícola que utilizavam água represada ou de córregos para a irrigação da plantação e 44,5 vezes mais risco de contaminação em animais que habitavam próximo a áreas alagadas (Azócar-Aedo et al., 2014).

A contaminação em gatos possivelmente ocorre através da captura de roedores previamente contaminados (Hartmann et al., 2013) ou através da urina contaminada advinda de animais selvagens ou cães coabitantes (Langston & Heuter, 2003). A infecção pode ocorrer não só pela ingestão de material contaminado, mas também através de contato com áreas lesadas da pele (Sonja et al., 2014).

CONCLUSÃO

Por muito tempo o gato não foi considerado alvo importante de controle em medidas públicas de saúde para a leptospirose, esse talvez tenha sido um ponto falho no controle da mesma e no atraso das pesquisas com esses animais. Mais estudos sobre os sorovares envolvidos na infecção, formas de contaminação e de disseminação do patógeno são de grande valia no desenvolvimento de estratégias de controle da doença na população humana e animal. Esses mesmos estudos podem também auxiliar na elucidação da patogenia da bactéria nessa espécie, e dar base médica para o tratamento desses pacientes.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. DE LA P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 287–296, 2010.
- AGUNLOYE, C. A.; NASH, A. S. Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland. **The Journal of small animal practice**, v. 37, n. 3, p. 126–129, 1996.
- ANDRÉ-FONTAINE, G. Canine leptospirosis—Do we have a problem? **Veterinary microbiology**, 2006.
- ARBOUR, J.; BLAIS, M.-C.; CARIOTO, L.; SYLVESTRE, D. Clinical Leptospirosis in Three Cats (2001-2009). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 48, p. 256–260, 2012.
- AZÓCAR-AEDO, L.; MONTI, G.; JARA, R. *Leptospira* spp. in Domestic Cats from Different Environments: Prevalence of Antibodies and Risk Factors Associated with the Seropositivity. **Animals**, v. 4, n. 4, p. 612–626, 2014.
- BEAUDU-LANGE, C.; LANGE, E. Unusual clinical presentation of leptospirosis in a cat. **Revue Vétérinaire Clinique**, v. 49, n. 3, p. 115–122, 2014.
- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, 2003.
- BRASIL, A. W. DE L.; PARANTONI, R. N.; FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L. R.; ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; AZEVEDO, S. S. DE. Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em gatos do semiárido do Estado da Paraíba. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 3215–3220, 2014.
- BRYSON, D.; ELLIS, W. Leptospirosis in a British domestic cat. **Journal of Small Animal Practice**, 1976.
- CHAN, K.-W.; HSU, Y.-H.; HU, W.-L.; PAN, M.-J.; LAI, J.-M.; HUANG, K.-C.; CHOU, S.-J. Serological and PCR detection of feline leptospira in southern Taiwan. **Vector borne and zoonotic diseases**, v. 14, n. 1, p. 118–23, 2014.
- FENIMORE, A.; CARTER, K.; LUNN, K. F. Detection of Leptospiruria in Shelter cats in Colorado. **Proceedings of the the 30th annual congress of the American College of Veterinary Internal Medicine - Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 3, p. 783, 2012.
- GREENE, C. E.; SYKES, J. E.; MOORE, G. E.; GOLDSTEIN, R. E.; D., R. S. Leptospirosis. In: GREENE C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 2012. ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2012. v. 1p. 431–447.
- HARTMANN, K. *et al.* *Leptospira* species infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 15, p. 576–81, 2013.
- LANGSTON, C. E.; HEUTER, K. J. Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 33, n. 4, p. 791–807, 2003.

LAPOINTE, C.; PLAMONDON, I.; DUNN, M. Feline leptospirosis serosurvey from a Quebec referral hospital. **Canadian Veterinary Journal**, v. 54, n. 5, p. 497–499, 2013.

LARSSON, C. E.; ROSA, C. A. S.; LARSSON, M. H.; BIRGEL, E. H.; FERNANDES, W. R.; PAIM, G. V.; SANTA ROSA, C. A.; LARSSON, M. H.; BIRGEL, E. H.; FERNANDES, W. R.; PAIM, G. V. Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis. **International journal of zoonoses**, v. 12, n. 2, p. 111–9, jun. 1985.

LÉVESQUE, B.; SERRES, G. DE. Seroepidemiologic study of three zoonoses (leptospirosis, Q fever, and tularemia) among trappers in Québec, Canada. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 2, n. 4, p. 496–498, 1995.

MARKOVICH, J. E.; ROSS, L.; MCCOBB, E. The prevalence of leptospiral antibodies in free roaming cats in worcester country, Massachusetts. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 2, p. 688–689, 2012.

MILLÁN, J.; CANDELA, M. G.; LÓPEZ-BAO, J. V.; PEREIRA, M.; JIMÉNEZ, M. A.; LEÓN-VIZCAÍNO, L. Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. **Vector borne and zoonotic diseases**, v. 9, n. 5, p. 549–554, 2009.

MITTESTAINER, J. C.; MELCHERT, A.; RIBEIRO, J. F. A.; SARTORI, R. S.; JOAQUIM, S. F.; BRESCIANI, K.; LANGONI, H. Estudo soroepidemiológico da infecção por *Leptospira* spp. em gatos. **Revista Veterinária e Zootécnica - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP**, v. 22, n. 3, p. 465–470, 2015.

POL, M. VAN DE. **Leptospirosis in wildlife and cats - Pilot study**. [s.l.] UTRECHT UNIVERSITY, 2016.

RODRIGUEZ, J.; BLAIS, M. C.; LAPOINTE, C.; ARSENAULT, J.; CARIOTO, L.; HAREL, J. Serologic and urinary PCR survey of leptospirosis in healthy cats and in cats with kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 2, p. 284–293, 2014.

SCHULLER, S.; FRANCEY, T.; HARTMANN, K.; HUGONNARD, M.; KOHN, B.; NALLY, J. E.; SYKES, J. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 3, p. 159–179, 2015.

SONJA, O.; SONJA, R.; NATAŠA, S.; DANICA, B.; SLOBODANKA, V.; MIROSLAV, V. Seroprevalence of Cat Leptospirosis in Belgrade (Serbia). **Acta Veterinaria**, v. 64, n. 4, p. 510–518, 2014.

WEIS, S.; RETTINGER, A.; BERGMANN, M.; LLEWELLYN, J. R.; PANTCHEV, N.; STRAUBINGER, R. K.; HARTMANN, K. Detection of *Leptospira* DNA in urine and presence of specific antibodies in outdoor cats in Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, 2016.

2 Comparison of three methods to preserve *Leptospira* spp. in cat urine for efficient DNA extraction and PCR amplification.

ABSTRACT

INTRODUCTION: For a long time, studies suggested that cats were resistant to leptospirosis, however, some clinical cases and the potential for shed leptospires in their urine are described. Endogenous substances present in urine can inhibit PCR, therefore we compare three approaches for sample processing to optimize detection of pathogenic leptospires in cat urine.

METHODS: Three protocols comparing the use of PBS to neutralize the leptospira-spiked urine samples before DNA extraction were performed. Different aliquots were added to urine samples to achieve concentrations of 1×10^5 to 1×10^2 leptospires/ml for each protocol. In protocol 1, PBS was added immediately after spiking of leptospires. In protocol 2, PBS was added only in the moment of DNA extraction. In protocol 3, no PBS was added. Extraction was performed at 4, 24 and 48 hours after bacterial spike for all protocols. PCR sensitivity was evaluated.

RESULTS: Leptospiral DNA was detected in no samples of protocol 2. In the protocol 1, leptospires were detected up to 1×10^3 (4h) and 1×10^4 (24 and 48h). In the protocol 3, leptospires were detected up to 1×10^4 (4h) and 1×10^5 (24 and 48h).

CONCLUSIONS: The addition of PBS in the urine sample is imperative for the viability of the DNA in the urine. Addition of PBS immediately after collection, as well as DNA extraction on the same day of urine collection, increases the sensitivity of PCR.

Key words: feline; leptospirosis; PBS; sensitivity.

INTRODUCTION

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by pathogenic leptospira species. Humans are susceptible hosts in which infection causes severe acute manifestations. Infection in rats, the maintenance hosts, causes an asymptomatic infection with persistent carriage. Leptospira infection in other mammalian species can cause two processes: a range of acute or chronic manifestations and produces a carrier state for which duration varies considerably between species⁽¹⁾. In cats, for a long time, studies suggest that they are resistant to acute leptospirosis; however, the description of some clinical cases proves that *Leptospira* spp. can be pathogenic to this species. Clinical manifestation of infection is rare, but kidney damage may be present⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾. Cats can shed leptospires in their urine intermittently for several weeks after experimental or natural infection⁽²⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾, accordingly, this information support cats as a potential source of infection for humans and others animals⁽²⁾.

The diagnosis in urine is made by the dark-field examination to identify leptospires or by PCR (Polymerase Chain Reaction) to leptospiral DNA detection. The PCR is useful for the rapid detection and more sensitivity, but sample processing for PCR has critical points and must be adjusted to the tissue, fluid, and species being tested⁽¹²⁾. Some DNA purification steps are also necessary before performing PCR amplification, because DNA degradation can lead to false negative results ⁽¹²⁾. These steps increase the cost of the test because require the use of expensive kits to purify DNA. In cats, some studies were performed using this kits⁽²⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾, but the extraction of DNA using in-house methods is not reported yet.

Endogenous substances present in urine can inhibit PCR and studies in cats using the in-house method of extraction were not reported yet. Therefore we compare three approaches for sample processing to optimize detection of pathogenic leptospires in cat urine.

METHODS

Bacterial strain

In this study, *Leptospira interrogans* serogroup Canicola, serovar Canicola, strain Hond Utrecht IV was used. The strain have been received from “Centro de diagnóstico Marcos Enrietti” (origin Fiocruz). The concentration of leptospires in a 2-week-old culture in liquid Ellinghausen-McCullough/Johnson-Harris medium was determined using a Petroff-Hauser Counting Chamber. The final concentration was 1×10^9 leptospires/ml.

Urine mixed with leptospires

Urine was collected by cystocentesis of a domestic shorthair cat with a strictly indoor living. The cat was 1-year-old, with no pre-existing illness neither use of drugs. The urine pH was 6.

The urine was spiked with known quantities of leptospires. Different aliquots were added to urine samples to achieve concentrations of 1×10^5 to 1×10^2 leptospires/ml for each protocol. All the samples were spiked at the same time (Figure 1).

Neutralization of urine

All the three protocols had urine samples with dilutions of 1×10^5 to 1×10^2 leptospires/ml. The urine was neutralized with addition of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, in a proportion of 1 PBS: 2.5 urine (v/v), in order to evaluate

the sensitivity of the PCR depending on the moment of PBS addition to neutralize the urine. In the protocol 1 PBS was added to the sample immediately after collection and spiked. In the protocol 2 PBS was added only in the moment of DNA extraction. In the protocol 3 PBS was not added at all (Figure 1). All samples were refrigerated at 4°C up to the time of extraction.

Due to PBS addition in protocol 1 and 2, these samples were further diluted when compared to the samples of protocol 3, reaching a final concentration of 0.7×10^5 , 0.7×10^4 , 0.7×10^3 and 0.7×10^2 . However, we consider the initial spiked concentration of leptospires in the samples to show the protocols details and the results, taking into account the bacteria concentration in the initial urine sample and not in the process.

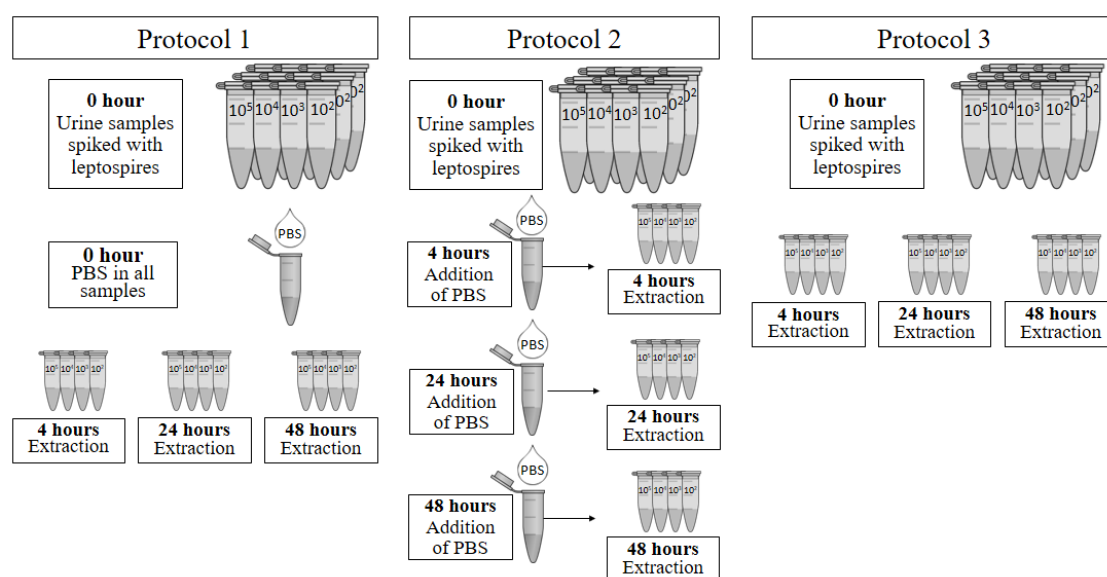


Figure 1- Demonstration of steps spiked, neutralize and extraction of urine samples in three different protocols to compare PCR sensitivity for detect leptospiral DNA in cat urine.

DNA extraction

DNA extraction from urine samples was performed using a modified protocol⁽¹²⁾ at 4, 24 and 48 hours. Samples of artificially inoculated urine, with

addition (protocols 1 and 2) or not (protocol 3) of PBS, were incubated at 37°C for 10 minutes, to eliminate amorphous sediment. On the next step, samples were centrifuged (3000 rpm) for 15 minutes, at 25°C. The supernatants were transferred to another tube, and the pellets were discarded to eliminate epithelial cells, leukocytes and crystals commonly present in urine. The supernatants were centrifuged (13000 rpm) for 20 minutes at 4°C. The supernatants were discarded, the pellets were resuspended and washed with 1000 µl of PBS. All the samples were centrifuged at 13000 rpm for an additional 20 minutes at 25°C. The supernatants were discarded and the pellets were resuspended in 100 µL of PBS and incubated at 94°C for 10 minutes. DNA was stored at -20°C until the molecular analysis.

PCR

The primer sets LIPL3245Fw (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3') and LIPL32286Rv (5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3') targeting the lipL32 gene (242 bp) of pathogenic leptospira species were used. PCR was performed in a total reaction mixture of 25 µl containing 5 µl of DNA template for the amplification, 1x PCR buffer (Invitrogen, Life Technologies, São Paulo, Brazil), 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 µM of each desoxynucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1.0 U of Taq DNA polymerase (Recombinant® Taq DNA Polymerase, Invitrogen) and 0.2 µM of each primer.

PCR was performed using the thermocycler (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Applied Biosystems California, USA). The amplification protocol consisted of 3 minutes at 94°C for initial denaturation, 35 cycles of amplification (denaturation at 94°C for 45 seconds, annealing at 52°C for 45 seconds and extension at 72°C for 45 seconds) and the final extension of 5 minutes at 72°C. Each run included

a negative control (ultrapure water), DNA extraction negative control and a positive control (DNA extracted from leptospire's cultures). The amplified PCR products were subjected to gel electrophoresis in 1.5% agarose gels for one hour at 100V, followed by ethidium bromide staining (0.5 µg/ml TBE buffer). Visualization and photography of the bands of the expected size products were performed under UV light (L-PIX-HE®, Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil) using the software L-PIX-IMAGE® (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil).

Sensitivity of primer sets

The fresh *L. interrogans* s.Canicola culture was used by tenfold serial dilution of 1×10^8 to 1×10^1 leptospores/ml in sterile PBS solution. DNA extraction was performed using 94°C for 10 minutes. To verify the sensitivity of leptospires detection for the primer sets, the PCR was performed with the same conditions of urine samples.

Ethical considerations

The protocol for this study was approved by the Universidade Federal do Parana Ethics Committee on Animal Research, under protocol number 057/2015.

RESULTS

In the test of sensitivity of the primer sets the leptospires were detected at dilution 1×10^3 or 5 copies/reaction.

In the urine samples the leptospiral DNA was detected in the protocol 1 up to 1×10^3 in extraction made in 4 hours and up to 1×10^4 in 24 and 48 hours. In the protocol 2, leptospires were detected in no samples. In the protocol 3, leptospires were detected up to 1×10^4 in extraction made in 4 hours and up to 1×10^5 in 24 and 48 hours (Table 1).

Table 1. Sensitivity of leptospiral DNA detection by PCR in cat urine comparing three protocols of storage sample.

Protocol	Hours for extraction	Dilution 1×10^5	Dilution 1×10^4	Dilution 1×10^3	Dilution 1×10^2
Protocol 1	4	+	+	+	-
	24	+	+	-	-
	48	+	+	-	-
Protocol 2	4	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
	48	-	-	-	-
Protocol 3	4	+	+	-	-
	24	+	-	-	-
	48	+	-	-	-

DISCUSSION

The primers sets used in this study had sensitivity and could detect leptospira DNA extracted from samples with the lowest concentration of 1×10^3 leptospores/ml, which is equivalent to DNA of 5 leptospores per PCR reaction, considering 5 μ l sample/reaction. Other studies could detected leptospiral DNA up to 8.3×10^2 (4.15 copies/reaction) in cats⁽²⁾ and 1×10^4 (50 copies/reaction) in humans⁽¹²⁾ both using G1 and G2 and B64-I/B64-II primers, also considering 5 μ l sample/reaction. The sensitivity of the primers sets used here is not its only advantage; differently from PCRs using G1 and G2 and B64-I/B64-II primers, these pair of primers do not require a reaction multiplex or 2 single-reaction to include the genomospecie *L.kirshneri*, which contain serogroups commonly found in animals (*Grippotyphosa*, *Autumnalis*, *Cynopteri*, *Hebdomadis*, *Australis*, *Pomona*, *Djasiman*, *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Bataviae*)⁽¹⁾.

Leptospores are sensitive to acid, at pH 6.8 or lower ⁽¹⁾ and the urine pH of cats can vary from 5 to 7⁽¹³⁾. In the present study we found the best results of DNA amplification with the addition of PBS after collection (protocol 1). Previous studies have shown the importance of neutralize the urine samples immediately

after collection to avoid loss of bacterial DNA in the extraction process⁽¹²⁾. However, protocols 2 and 3 may be an alternative in clinical practice when the PBS cannot be added immediately to the sample.

On the other hand, when PBS was added only in the moment of extraction (protocol 2), DNA could not be detected in any concentration, we hypothesized that it would be possibly explained by two aggravating factors: the initial non-neutralization plus the increase in the final dilution of the sample. In the sensitivity test of primer it was observed that after four hours in contact with acid urine (pH 6) the leptospires could not be detected by PCR in concentrations lower than 1×10^4 in the samples without PBS (protocol 3). It indicates a 10-fold decrease in the sensitivity, compared to the samples of protocol 1.

The moment of extraction is one more factor that can interfere with the sensibility of PCR. This was observed in the samples of protocol 1, because though the neutralize was made correctly, the results at 24 and 48 hours demonstrated a 10-fold decrease in the sensitivity of the test. The leptospires lose their integrity rapidly in urine, and their detection number declines considerably over time, then prompt extraction is crucial for the sensitivity⁽¹²⁾.

The present results evidenced that the in-house method is useful for leptospiral DNA extraction of cat urine. Beside highlight the importance of neutralize the urine samples immediately after collection and execute the prompt extraction to increases the sensitivity of PCR. However, if the PBS won't be immediately added to the collected sample, the sample should be processed without PBS and extracted soon for more sensitive results, avoiding false-negatives.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

FINANCIAL SUPPORT

This research was supported financially by the “Chamada universal MCTI/CNPq n°01/2016”

REFERENCES

1. Faine. S., Adler. B., Bolin. C. PP. *Leptospira and leptospirosis*. 2º ed. MedScience; 1999.
2. Rodriguez J, Blais MC, Lapointe C, Arsenault J, Carioto L, Harel J. Serologic and urinary PCR survey of leptospirosis in healthy cats and in cats with kidney disease. *J. Vet. Intern. Med.* 2014;28(2):284–93.
3. Agunloye C a, Nash a S. Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland. *J. Small Anim. Pract.* 1996;37(3):126–9.
4. Beaudu-Lange C, Lange E. Unusual clinical presentation of leptospirosis in a cat. *Rev. Vétérinaire Clin.* 2014;49(3):115–22.
5. Lévesque B, Serres G De. Seroepidemiologic study of three zoonoses (leptospirosis, Q fever, and tularemia) among trappers in Québec, Canada. *Clin. diagnostic Lab. Immunol.* 1995;2(4):496–8.
6. Millán J, Candela MG, López-Bao JV, Pereira M, Jiménez MA, León-Vizcaíno L. Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. *Vector borne zoonotic Dis.* 2009;9(5):549–54.
7. Arbour J, Blais M-C, Carioto L, Sylvestre D. Clinical Leptospirosis in Three Cats (2001-2009). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 2012;48:256–60.

8. Weis S, Rettinger A, Bergmann M, Llewellyn JR, Pantchev N, Straubinger RK, et al. Detection of *Leptospira* DNA in urine and presence of specific antibodies in outdoor cats in Germany. *J. Feline Med. Surg.* 2016;
9. Chan K-W, Hsu Y-H, Hu W-L, Pan M-J, Lai J-M, Huang K-C, et al. Serological and PCR detection of feline leptospira in southern Taiwan. *Vector borne zoonotic Dis.* 2014;14(1):118–23.
10. Fenimore A, Carter K, Lunn KF. Detection of Leptospiuria in Shelter cats in Colorado. *Proc. 30th Annu. Congr. Am. Coll. Vet. Intern. Med. - J. Vet. Intern. Med.* 2012;26(3):783.
11. Larsson CE, Rosa CAS, Larsson MH, Birgel EH, Fernandes WR, Paim G V, et al. Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis. *Int. J. Zoonoses* 1985;12(2):111–9.
12. Lucchesi PM a, Arroyo GH, Etcheverría AI, Parma AE, Seijo AC. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2004;37(2):131–4.
13. Holt PE. Urological disorders of the dog and cat - Investigation, diagnosis and treatment. 1^o ed. Manson Publishing Ltd; 2008.

3 ANTICORPOS ANTI-*Leptospira* spp.E LEPTOSPIRÚRIA EM GATOS NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA/PR-BRASIL

*Anti-Leptospira spp. antibodies and leptospiuria in cats in the metropolitan area
of Curitiba, State of Paraná - Brazil*

RESUMO

A leptospirose ainda é pouco elucidada em gatos e o papel da espécie na epidemiologia da doença é indeterminado. São raros os dados sobre a doença clínica, no entanto, os gatos podem produzir resposta com anticorpos específicos após infecção. Estudos sorológicos demonstram valores de prevalência variando de 5,6 a 33%. Apesar da maior resistência da espécie, não se deve ignorar a possibilidade de transmissão, pois é comprovado que após infecção ou doença pode ocorrer eliminação do patógeno na urina. Neste estudo objetivou-se detectar leptospiúria por reação em cadeia da polimerase (PCR) e anticorpos contra *L. interrogans* com o uso de soroaglutinação microscópica (SAM) em gatos expostos a fatores associados a infecção na região metropolitana de Curitiba/PR. Foram coletadas amostras de sangue e urina de 65 gatos (13 de São José dos Pinhais e 52 de Pinhais), no período de agosto a novembro de 2016. Ao todo três animais (4,6%) foram soropositivos para o sorovar Pomona, com títulos variando de 200 a 400. Das 65 amostras de urina, uma (1,53%) foi positiva na PCR. Sendo assim, podemos concluir que gatos da região metropolitana de Curitiba/PR expostos a fatores associados a infecção estão suscetíveis a se contaminarem com *Leptospira* spp. e podem apresentar leptospiúria.

Palavras chaves: felinos; leptospirose; saúde pública; sorologia; zoonose

ABSTRACT

Leptospirosis is still poorly known in cats and the role of the specie in the disease epidemiology is indeterminate. Clinical disease descriptions are rare, although cats may produce response with specific antibodies after infection. Serological studies have showed a varying prevalence from 6.96 to 26.7%. Despite the specie's larger resistance, the transmission possibility should not be ignored since is confirmed that after infection or disease the pathogen can be eliminated in the urine. The study's objective was to detect leptospiuria by polymerase chain reaction (PCR) and anti-*Leptospira* spp. Antibodies by microscopic agglutination test (MAT) in cats exposed to infection association factors in the metropolitan zone of Curitiba / PR. Blood and urine samples were collected from 65 cats (13 from São José dos Pinhais and 52 from Pinhais) from august to november 2016(th). Three animals (4.6%) were seropositive for the Pomona serovar, with titles ranging from 200 to 400. Of all the 65 samples collected, one (1.53%) was PCR positive. As a result, we can conclude that cats from the metropolitan area of Curitiba/PR exposed to infection associated factors are susceptible to contamination with *Leptospira* spp. and may show leptospiuria.

Key words: Cat; Leptospirosis; Public health; Serology; Zoonosis

INTRODUÇÃO

A leptospirose é um problema de saúde pública de importância mundial e afeta grande parte dos mamíferos, incluindo o homem (Bharti *et al.*, 2003). É considerada uma doença sistêmica em seres humanos e em diversos animais, com uma quantidade variada de sinais, dentre eles: febre, insuficiência renal e hepática, alterações pulmonares e alterações reprodutivas. Muitos casos podem

ser subclínicos e geralmente associados a sorovares adaptados ao hospedeiros (André-Fontaine, 2006). Após recuperação da doença clínica alguns animais podem tornar-se portadores assintomáticos, e contaminarem o ambiente por longos períodos com eliminação de leptospiros pela urina (Adler & Moctezuma, 2010). A grande quantidade de espécies capazes de albergar e eliminar a bactéria assegura a persistência do agente no ambiente e também o elevado potencial de infecção (Markovich *et al.*, 2012).

Por muito tempo acreditou-se que os gatos possuíam resistência à infecção, produção de doença clínica ou resposta com anticorpos específicos. No entanto, estudos sorológicos demonstram valores de prevalência variando de 5,6 a 33% e diversos sorogrupos são relatados. Há também relato de sinais clínicos de poliúria e polidipsia entre os animais positivos (Lévesque & Serres, 1995; Agunloye & Nash, 1996; Millán *et al.*, 2009; Lapointe *et al.*, 2013). Em um relato de caso, a clínica do paciente foi comparada a clínica subaguda do cão com leptospirose (Beaudu-Lange & Lange, 2014). Rodriguez *et al.*, (2014) sugeriram que a infecção por *L. interrogans* pode ser uma causa subdiagnosticada da doença renal aguda ou crônica em gatos. Afirmaram ainda que a leptospirose deveria ser investigada como uma causa potencial de lesão renal em gatos, especialmente quando houver fatores de risco associados.

Os felinos são cada vez mais frequentes nos domicílios e geralmente possuem estreita relação humano-animal, fatos que corroboram para um possível aumento no risco de ocorrência de zoonoses no núcleo familiar, principalmente em animais portadores assintomáticos. Apesar da maior resistência da espécie, não se deve ignorar a possibilidade de transmissão, pois é comprovado que após infecção ou doença pode ocorrer eliminação do

patógeno na urina (Arbour *et al.*, 2012; Fenimore *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2014; Rodriguez *et al.*, 2014; Pol, 2016). Ainda não há informações sobre a ocorrência de leptospiros em gatos na região metropolitana de Curitiba/PR. Neste estudo objetivou-se detectar leptospirúria por reação em cadeia da polimerase (PCR) e anticorpos contra *L. interrogans* com o uso de soroaglutinação microscópica (SAM) em gatos expostos a fatores associados à infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Gatos provenientes de campanhas de castração realizadas em associação do Hospital Veterinário da UFPR com os municípios de Pinhais e São José dos Pinhais, no período de agosto a novembro de 2016. Os critérios de inclusão e fatores associados à infecção foram: "livre acesso à rua" ou "período de vida livre" e/ou "contato prévio com roedores". E como critério de exclusão "tratamento há menos de 3 meses com doxiciclina".

O trabalho foi aprovado pelo Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), protocolo nº 057/2015.

Questionários

Com o objetivo de avaliar fatores associados a infecção e possíveis sinais clínicos, foram aplicados questionários aos responsáveis pelos animais (Anexo 1). As informações obtidas foram: idade, gênero, tratamentos realizados há menos de 1 ano, histórico clínico, sinais clínicos atuais, número de contactantes, histórico de resgate ou adoção, acesso livre a área externa, contato com roedores, hábito de caça, contato com animais silvestres ou de produção, saneamento básico na região da habitação e risco de alagamento ou presença

de rios. Os responsáveis também assinaram termo de consentimento para participação na pesquisa.

Amostras

Como os animais já seriam anestesiados para o procedimento cirúrgico de castração, as amostras de sangue e urina foram coletadas somente após sedação, com o intuito de evitar estresse pela contenção e manejo desnecessário. A amostra de sangue (1 a 2 mL) foi coletada da veia jugular e armazenada em tubos sem anticoagulante. Foi posteriormente centrifugada a 600 rpm por 15 minutos para obtenção do soro. O soro foi separado e armazenado à temperatura de -20°C para posterior análise sorológica.

As amostras de urina foram coletadas por cistocentese (2 a 10 mL). Imediatamente após a coleta, a urina foi fracionada em duas alíquotas, sendo a primeira armazenada em tubo falcon com adição imediata de tampão fosfato salino (PBS) na proporção de 1 PBS : 2,5 urina (v/v) com objetivo de neutralização da mesma para posterior extração de DNA. A segunda alíquota foi armazenada em tubo coletor universal para posterior refratometria e análise química (Tira reagente de urinálise ComburTestRoche®). As amostras foram mantidas refrigeradas a 4°C até os processos de extração e urinálise (máximo 4 horas).

Sorologia (SAM)

Os soros foram encaminhados ao Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti para a realização do método de soroaglutinação microscópica (SAM). Foram consideradas positivas as amostras com títulos maiores ou iguais a 100. Os sorovares testados foram: Autumnalis, Bratislava, Canicola, Castellonis,

Copenhageni, Cypnopteri, Grippytyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Pyrogenes.

Previamente aos testes, os antígenos foram examinados ao microscópio de campo escuro com o objetivo de verificar a sua mobilidade, a presença de auto aglutinação ou de contaminantes. Os soros foram triados na diluição de 1:50, e aqueles que apresentaram 50% ou mais de aglutinação foram titulados com uma série de diluições geométricas de razão dois. O título do soro foi a recíproca da maior diluição que apresentou resultado positivo.

Extração de DNA

Para a extração de DNA das amostras de urina foi utilizado um protocolo modificado (Lucchesi *et al.*, 2004). O mesmo foi previamente testado com urina de gato sabidamente negativa e contaminação com quantidades conhecidas de *Leptospira spp.* nas concentrações de 10^5 até 10^2 leptospiras/mL de urina. A sensibilidade do procedimento foi de 10^4 leptospiras/mL ou 5 cópias/reação com extrações realizadas até 4 horas após coleta e contaminação.

As amostras de urina, previamente neutralizadas com PBS, foram fracionadas em duas alíquotas de 1,5 mL e então passaram por incubação a 37°C durante 10 minutos. Foi então realizada centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos, os sobrenadantes de cada amostra foram preservados e foram desprezados os pellets formados. Os sobrenadantes foram então centrifugados a 13000 rpm durante 20 minutos, após isso foram descartados os sobrenadantes e preservados os pellets. Foi adicionado 1 mL de PBS a cada alíquota com a devida homogeneização, e feita nova centrifugação a 13000 rpm com duração de 20 minutos. Novamente foram descartados os sobrenadantes e preservados os pellets com nova diluição com PBS na quantidade de 100 µl. As amostras

foram incubadas a 94°C durante 10 minutos e ao fim do processo foram armazenadas a -20°C para posterior análise molecular.

PCR

Os primers usados foram: LIPL3245Fw (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3') e LIPL32286Rv (5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3') dirigidos ao gene LipL32 (242pb). A reação de PCR foi realizada com uma mistura total de reação de 25 µl contendo: 5 µl da amostra, 1x PCR buffer (Invitrogen, Life Technologies, São Paulo, Brasil), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, DCTP, dGTP, dTTP), 1,0 U de Taq DNA polimerase (Recombinant® Taq DNA Polymerase, Invitrogen) e 0,2 µM de cada primer.

A PCR foi realizada utilizando o termociclador (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Applied Biosystems, Califórnia, EUA). O protocolo de amplificação consistiu em 3 minutos a 94°C para desnaturação inicial, 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C durante 45 segundos, anelamento a 52°C durante 45 segundos e extensão a 72°C durante 45 segundos) e a extensão final foi de 5 minutos a 72°C. Cada reação incluiu um controle negativo (água ultrapura), controle negativo da extração de DNA e um controle positivo (DNA extraído de culturas de leptospiros). Os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% durante 1 hora a 100V, seguido por coloração com brometo de etídio (0,5 µg/mL de tampão TBE). A visualização e a fotografia das bandas dos produtos de tamanho esperado foram realizadas sob luz ultravioleta (L-PIX-HE®, Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil) utilizando o software L-PIX-IMAGE® (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil).

Sensibilidade dos primers

Foi utilizada uma cultura fresca de *Leptospira interrogans* s. Canicola para criar uma diluição seriada de 1×10^8 até 1×10^1 leptospiplas/mL em solução estéril de PBS. O DNA dessas amostras foi extraído com a incubação das mesmas por 10 minutos a 94°C e a PCR foi realizada seguindo as mesmas condições das demais amostras. O par de primers mostrou sensibilidade de reconhecer até 1×10^3 leptospiplas/mL ou 5 cópias/reação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados um total de 65 gatos, sendo 3 (4,6%) soropositivos (Tabela 1). Dos 52 gatos (27 machos e 25 fêmeas) examinados provenientes do município de Pinhais, um (1,9%) foi soropositivo para a o sorovar Pomona com título 100. No município de São José dos Pinhais, dos 13 animais coletados (6 machos e 7 fêmeas), dois (15,4%) foram positivos para o sorovar Pomona com títulos 200 e 400. Outros estudos em gatos também demonstram títulos de anticorpos baixos, variando de 100 até 400 (Lapointe *et al.*, 2013; Azócar-Aedo *et al.*, 2014; Brasil *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2014; Rodriguez *et al.*, 2014; Garoussi *et al.*, 2015). A razão para os valores baixos permanece desconhecida, alguns autores sugerem que isso possa ocorrer por uma resposta imune rápida, seguida de rápido declínio no título (Shophet & Marshall, 1980) ou pela necessidade de baixos títulos de anticorpos para controlar a infecção (Rodriguez *et al.*, 2014). Há a hipótese também que os sorovares que afetam os gatos podem ainda não ser descritos ou serem diferentes dos habitualmente testados para cães e humanos, sendo assim a prevalência dos estudos estaria correlacionada a reações cruzadas entre os sorovares (Markovich *et al.*, 2012).

O sorovar Pomona encontrado nos três animais positivos foi relatado também como o mais comum em alguns estudos em gatos, como em Patos, PB/Brasil (Brasil *et al.*, 2014) em Montreal/Canadá (Rodriguez *et al.*, 2014) e no relato de 3 casos clínicos de leptospirose em gatos também em Montreal/Canadá (Arbour *et al.*, 2012). É também um dos três sorovares mais comuns em outros estudos sorológicos em gatos (Jamshidi *et al.*, 2009; Sonja *et al.*, 2014; Garoussi *et al.*, 2015). Esse sorovar é geralmente encontrado em suínos, considerados reservatórios primários do mesmo (Faine *et al.*, 1999). No entanto, no presente estudo, nas análises feitas com o uso dos questionários não foi relatado nenhum contato dos gatos positivos com essa espécie animal. Sendo assim, esse achado pode representar reações cruzadas com outros sorovares não testados ou contato direto ou indireto com alguma outra espécie animal. Com base nos questionários dos três animais os possíveis fatores associados a infecção podem ser: hábito de caça, contato com roedores, acesso à rua e coabitar com outros gatos e cães. Um dos animais possuía outros possíveis fatores associados a infecção, tais como: contato com animais silvestres (gambás), contato com animais de produção (bovinos), habitar em local sem saneamento básico e possibilidade de alagamento da região da habitação em épocas de chuva. Segundo a literatura a contaminação em gatos ocorre possivelmente através da captura de roedores previamente contaminados (Hartmann *et al.*, 2013) ou através da urina contaminada advinda de animais selvagens ou cães coabitantes (Langston & Heuter, 2003). A infecção pode ocorrer não só pela ingestão de material contaminado, mas também através de contato com áreas lesadas da pele (Sonja *et al.*, 2014). Os fatores associados a infecção mais comumente relatados são: hábito de caça, coabitantes de outro gato e acesso à rua (Bryson

& Ellis, 1976; Arbour *et al.*, 2012; Beaudu-Lange & Lange, 2014; Rodriguez *et al.*, 2014). O ambiente parece também ter influência na infecção, esse fator é relatado para gatos que vivem em áreas inundadas (Azócar-Aedo *et al.*, 2014), áreas com criação de bovinos (Garoussi *et al.*, 2015) e áreas com criação de suínos (Brasil *et al.*, 2014).

A pesquisa de anticorpos pela técnica de SAM é considerada prova padrão ouro pela Organização Mundial de Saúde, porém faz se necessária a relação desses resultados com a pesquisa de DNA bacteriano em amostras de urina, para avaliação do estado de portador renal desses animais (Greene *et al.*, 2012; Mittestainer *et al.*, 2015). Além disso, em cães é relatada a ocorrência de animais que apresentam leptospirúria com resultados negativos na SAM, sendo assim uma falha da técnica na identificação de possíveis portadores renais (Harkin *et al.*, 2003). Em gatos isso pode ser visto também em um estudo em que 50 animais apresentaram leptospirúria na PCR, mas tinham resultados negativos na SAM (Chan *et al.*, 2014). Desta forma foram avaliadas pela técnica de PCR todas as urinas coletadas dos 65 animais, sendo uma positiva (Tabela 1), proveniente das coletas realizadas no município de São José dos Pinhais. Nesse caso o animal apresentava também sorologia positiva com título 200 para o sorovar Pomona. Outros estudos também demonstraram leptospirúria em gatos e com isso os caracterizaram como reservatórios (Arbour *et al.*, 2012; Fenimore *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2014; Rodriguez *et al.*, 2014). Entretanto, o risco exato de contaminação de outros mamíferos, incluindo os seres humanos, a partir de gatos infectados ainda é desconhecido (Schuller *et al.*, 2015).

Tabela 1 – Dados e possíveis fatores associados a infecção dos gatos positivos na sorologia (SAM) e PCR.

	Animal 1	Animal 2	Animal 3
Sexo	Fêmea	Macho	Macho
Idade	2 anos	8 meses	3 anos
Origem	São José dos Pinhais	São José dos Pinhais	Pinhais
SAM	Pomona 200	Pomona 400	Pomona 100
PCR urina	Positivo	Negativo	Negativo
Acesso à rua	Sim	Sim	Sim
Hábito de caça	Sim	Sim	Sim
Contato com roedores	Sim	Sim	Não
Contato com animais silvestres	Sim (Gambás)	Não	Não
Contato com animais de produção	Sim (Bovinos)	Não	Não
Coabitantes	Cães (7) Gatos (2)	Cães (9) Gatos (9)	Cão (1)
Saneamento básico na região	Não	Sim	Sim
Possibilidade de alojamento na região	Sim	Não	Não

A responsável pelo gato com leptospirose negou doenças anteriores e sinais clínicos. Porém, após procedimento cirúrgico o animal apresentou quadro de desidratação e hipotermia (34°C), necessitando de ressuscitação volêmica para recuperação pós anestésica. O exame da urina, coletada antes do procedimento cirúrgico e de fluidoterapia, teve como resultados: densidade urinária 1,024, pH 8 e sem demais alterações. Esses dados de desidratação após privação hídrica (jejum pré-cirúrgico) com baixa densidade urinária sugerem possível alteração renal, que corrobora com dados encontrados na literatura, como na compilação de 3 casos de leptospirose em gatos, no qual os animais apresentaram diferentes estágios de doença renal, sem nenhum sinal de doença hepática (Arbour *et al.*, 2012). Outro estudo verificou diferença significativa entre os resultados sorológicos de um grupo de gatos com doença

renal e outro considerado saudável, sugerindo que a infecção por *L. interrogans* pode ser uma causa subdiagnosticada da doença renal aguda ou crônica na espécie (Rodriguez *et al.*, 2014).

Por muito tempo o gato não foi considerado alvo importante de controle em medidas públicas de saúde para a leptospirose, esse talvez tenha sido um ponto falho no controle da mesma e no atraso das pesquisas com esses animais. Mais estudos sobre os sorovares envolvidos na infecção, formas de contaminação e de disseminação do patógeno são de grande valia no desenvolvimento de estratégias de controle da doença na população humana e animal. Esses mesmos estudos podem também auxiliar na elucidação da patogenia da bactéria nessa espécie, e dar base médica para o tratamento desses pacientes.

CONCLUSÃO

Gatos da região metropolitana de Curitiba/PR estão suscetíveis a infecção por *Leptospira* spp. e podem apresentar leptospirose. Sendo assim, o papel de gatos como fonte de infecção ambiental ou de outros animais provavelmente está sendo subestimado. E possivelmente também o papel do agente como causador de alterações renais nessa espécie.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. DE LA P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 287–296, 2010.
- AGUNLOYE, C. A; NASH, A S. Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland. **The Journal of small animal practice**, v. 37, n. 3, p. 126–129, 1996.
- ANDRÉ-FONTAINE, G. Canine leptospirosis—Do we have a problem? **Veterinary microbiology**, 2006.
- ARBOUR, J.; BLAIS, M.-C.; CARIOTO, L.; SYLVESTRE, D. Clinical Leptospirosis in Three Cats (2001-2009). **Journal of the American Animal**

Hospital Association, v. 48, p. 256–260, 2012.

AZÓCAR-AEDO, L.; MONTI, G.; JARA, R. Leptospira spp. in Domestic Cats from Different Environments: Prevalence of Antibodies and Risk Factors Associated with the Seropositivity. **Animals**, v. 4, n. 4, p. 612–626, 2014.

BEAUDU-LANGE, C.; LANGE, E. Unusual clinical presentation of leptospirosis in a cat. **Revue Vétérinaire Clinique**, v. 49, n. 3, p. 115–122, 2014.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, 2003.

BRASIL, A. W. DE L.; PARANTONI, R. N.; FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L. R.; ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; AZEVEDO, S. S. DE. Anticorpos anti-Leptospira spp. em gatos do semiárido do Estado da Paraíba. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 3215–3220, 2014.

BRYSON, D.; ELLIS, W. Leptospirosis in a British domestic cat. **Journal of Small Animal Practice**, 1976.

CHAN, K.-W.; HSU, Y.-H.; HU, W.-L.; PAN, M.-J.; LAI, J.-M.; HUANG, K.-C.; CHOU, S.-J. Serological and PCR detection of feline leptospira in southern Taiwan. **Vector borne and zoonotic diseases**, v. 14, n. 1, p. 118–23, 2014.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2. ed. [s.l.] MedScience, 1999.

FENIMORE, A.; CARTER, K.; LUNN, K. F. Detection of Leptospiruria in Shelter cats in Colorado. **Proceedings of the the 30th annual congress of the American College of Veterinary Internal Medicine - Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 3, p. 783, 2012.

GAROUCSI, M. T.; MEHRAVARAN, M.; ABDOLLAHPOUR, G.; KHOSHNEGAH, J. Seroprevalence of leptospiral infection in feline population in urban and dairy cattle herds in Mashhad , Iran. v. 6, n. 4, p. 301–304, 2015.

GREENE, C. E.; SYKES, J. E.; MOORE, G. E.; GOLDSTEIN, R. E.; D., R. S. Leptospirosis. In: GREENE C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 2012. ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2012. v. 1p. 431–447.

HARKIN, K. R.; ROSHTO, Y. M.; SULLIVAN, J. T.; PURVIS, T. J.; CHENGAPPA, M. M. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 9, p. 1230–1233, maio 2003.

HARTMANN, K. *et al.* Leptospira species infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 15, p. 576–81, 2013.

JAMSHIDI, S.; AKHAVIZADEGAN, M.; BOKAIE, S.; MAAZI, N.; GHORBAN ALI, A. Serologic study of feline leptospirosis in Tehran , Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 32–36, 2009.

LANGSTON, C. E.; HEUTER, K. J. Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 33,

n. 4, p. 791–807, 2003.

LAPOINTE, C.; PLAMONDON, I.; DUNN, M. Feline leptospirosis serosurvey from a Quebec referral hospital. **Canadian Veterinary Journal**, v. 54, n. 5, p. 497–499, 2013.

LÉVESQUE, B.; SERRES, G. DE. Seroepidemiologic study of three zoonoses (leptospirosis, Q fever, and tularemia) among trappers in Québec, Canada. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 2, n. 4, p. 496–498, 1995.

LUCCHESI, P. M. A; ARROYO, G. H.; ETCHEVERRÍA, A. I.; PARMA, A. E.; SEIJO, A. C. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 2, p. 131–134, 2004.

MARKOVICH, J. E.; ROSS, L.; MCCOBB, E. The prevalence of leptospiral antibodies in free roaming cats in Worcester county, Massachusetts. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 2, p. 688–689, 2012.

MILLÁN, J.; CANDELA, M. G.; LÓPEZ-BAO, J. V.; PEREIRA, M.; JIMÉNEZ, M. A.; LEÓN-VIZCAÍNO, L. Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. **Vector borne and zoonotic diseases**, v. 9, n. 5, p. 549–554, 2009.

MITTESTAINER, J. C.; MELCHERT, A.; RIBEIRO, J. F. A.; SARTORI, R. S.; JOAQUIM, S. F.; BRESCIANI, K.; LANGONI, H. Estudo soroepidemiológico da infecção por *Leptospira* spp. em gatos. **Revista Veterinária e Zootécnica - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP**, v. 22, n. 3, p. 465–470, 2015.

POL, M. VAN DE. **Leptospirosis in wildlife and cats - Pilot study**. [s.l.] UTRECHT UNIVERSITY, 2016.

RODRIGUEZ, J.; BLAIS, M. C.; LAPOINTE, C.; ARSENAULT, J.; CARIOTO, L.; HAREL, J. Serologic and urinary PCR survey of leptospirosis in healthy cats and in cats with kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 2, p. 284–293, 2014.

SCHULLER, S.; FRANCEY, T.; HARTMANN, K.; HUGONNARD, M.; KOHN, B.; NALLY, J. E.; SYKES, J. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 3, p. 159–179, 2015.

SHOPHET, R.; MARSHALL, R. B. An experimentally induced predator chain transmission of *Leptospira ballum* from mice to cats. **British Veterinary Journal**, v. 3, p. 265–270, 1980.

SONJA, O.; SONJA, R.; NATAŠA, S.; DANICA, B.; SLOBODANKA, V.; MIROSLAV, V. Seroprevalence of Cat Leptospirosis in Belgrade (Serbia). **Acta Veterinaria**, v. 64, n. 4, p. 510–518, 2014.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa dissertação evidenciou que os gatos expostos a fatores associados a infecção provenientes da região metropolitana de Curitiba/PR podem apresentar leptospiúria e alterações clínicas após infecções naturais. Sendo assim, a hipótese de resistência a infecção por *Leptospira* spp. nessa espécie deve ser definitivamente esquecida para que se volte mais atenção ao estudo dessa enfermidade na espécie. Somente assim o papel dos gatos na epidemiologia será melhor compreendido, o que possibilitará na implantação de medidas públicas de saúde para a redução do possível risco zoonótico. Salientamos ainda a necessidade de mais estudos que elucidem a doença clínica em gatos para que medidas de prevenção e terapêutica possam ser instituídas.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. DE LA P. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 287–296, 2010.
- AGUNLOYE, C. A; NASH, A S. Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland. **The Journal of small animal practice**, v. 37, n. 3, p. 126–129, 1996.
- ANDRÉ-FONTAINE, G. Canine leptospirosis—Do we have a problem? **Veterinary microbiology**, 2006.
- ARBOUR, J.; BLAIS, M.-C.; CARIOTO, L.; SYLVESTRE, D. Clinical Leptospirosis in Three Cats (2001-2009). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 48, p. 256–260, 2012.
- AZÓCAR-AEDO, L.; MONTI, G.; JARA, R. Leptospira spp. in Domestic Cats from Different Environments: Prevalence of Antibodies and Risk Factors Associated with the Seropositivity. **Animals**, v. 4, n. 4, p. 612–626, 2014.
- BEAUDU-LANGE, C.; LANGE, E. Unusual clinical presentation of leptospirosis in a cat. **Revue Vétérinaire Clinique**, v. 49, n. 3, p. 115–122, 2014.
- BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, 2003.
- BRASIL, A. W. DE L.; PARANTONI, R. N.; FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L. R.; ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; AZEVEDO, S. S. DE. Anticorpos anti-Leptospira spp. em gatos do semiárido do Estado da Paraíba. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 3215–3220, 2014.
- BRYSON, D.; ELLIS, W. Leptospirosis in a British domestic cat. **Journal of Small Animal Practice**, 1976.
- CHAN, K.-W.; HSU, Y.-H.; HU, W.-L.; PAN, M.-J.; LAI, J.-M.; HUANG, K.-C.; CHOU, S.-J. Serological and PCR detection of feline leptospira in southern Taiwan. **Vector borne and zoonotic diseases**, v. 14, n. 1, p. 118–23, 2014.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. Leptospira and leptospirosis. 2. ed. [s.l.] **MedScience**, 1999.
- FENIMORE, A.; CARTER, K.; LUNN, K. F. Detection of Leptospiruria in Shelter cats in Colorado. Proceedings of the the 30th annual congress of the American College of Veterinary Internal Medicine - **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 3, p. 783, 2012.
- GAROOUSSI, M. T.; MEHRAVARAN, M.; ABDOLLAHPOUR, G.; KHOSHNEGAH, J. Seroprevalence of leptospiral infection in feline population in urban and dairy cattle herds in Mashhad, Iran. **Veterinary Research Forum**, v. 6, n. 4, p. 301–304, 2015.
- GREENE, C. E.; SYKES, J. E.; MOORE, G. E.; GOLDSTEIN, R. E.; D., R. S. Leptospirosis. In: GREENE C. E. (Ed.). . Infectious diseases of the dog and cat. 2012. ed. [s.l.] **Elsevier Ltd**, 2012. v. 1p. 431–447.

- HARKIN, K. R.; ROSHTO, Y. M.; SULLIVAN, J. T.; PURVIS, T. J.; CHENGAPPA, M. M. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 9, p. 1230–1233, maio 2003.
- HARTMANN, K. et al. Leptospira species infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 15, p. 576–81, 2013.
- HOLT, P. E. Urological disorders of the dog and cat - Investigation, diagnosis and treatment. 1. ed. [s.l.] **Manson Publishing Ltd**, 2008.
- JAMSHIDI, S.; AKHAVIZADEGAN, M.; BOKAIE, S.; MAAZI, N.; GHORBAN ALI, A. Serologic study of feline leptospirosis in Tehran , Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 32–36, 2009.
- LANGSTON, C. E.; HEUTER, K. J. Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 33, n. 4, p. 791–807, 2003.
- LAPOINTE, C.; PLAMONDON, I.; DUNN, M. Feline leptospirosis serosurvey from a Quebec referral hospital. **Canadian Veterinary Journal**, v. 54, n. 5, p. 497–499, 2013.
- LARSSON, C. E.; ROSA, C. A. S.; LARSSON, M. H.; BIRGEL, E. H.; FERNANDES, W. R.; PAIM, G. V.; SANTA ROSA, C. A.; LARSSON, M. H.; BIRGEL, E. H.; FERNANDES, W. R.; PAIM, G. V. Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis. **International journal of zoonoses**, v. 12, n. 2, p. 111–9, jun. 1985.
- LÉVESQUE, B.; SERRES, G. DE. Seroepidemiologic study of three zoonoses (leptospirosis, Q fever, and tularemia) among trappers in Québec, Canada. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 2, n. 4, p. 496–498, 1995.
- LUCCHESI, P. M. A; ARROYO, G. H.; ETCHEVERRÍA, A. I.; PARMA, A. E.; SEIJO, A. C. Recommendations for the detection of Leptospira in urine by PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 2, p. 131–134, 2004.
- MARKOVICH, J. E.; ROSS, L.; MCCOBB, E. The prevalence of leptospiral antibodies in free roaming cats in worcester country, **Massachusetts**. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 2, p. 688–689, 2012.
- MILLÁN, J.; CANDELA, M. G.; LÓPEZ-BAO, J. V.; PEREIRA, M.; JIMÉNEZ, M. A.; LEÓN-VIZCAÍNO, L. Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. **Vector borne and zoonotic diseases**, v. 9, n. 5, p. 549–554, 2009.
- MITTESTAINER, J. C.; MELCHERT, A.; RIBEIRO, J. F. A.; SARTORI, R. S.; JOAQUIM, S. F.; BRESCIANI, K.; LANGONI, H. Estudo soroepidemiológico da infecção por Leptospira spp. em gatos. **Revista Veterinária e Zootecnia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP**, v. 22, n. 3, p. 465–470, 2015.
- POL, M. VAN DE. Leptospirosis in wildlife and cats - Pilot study. [s.l.] **UTRECHT UNIVERSITY**, 2016.

RODRIGUEZ, J.; BLAIS, M. C.; LAPOINTE, C.; ARSENAULT, J.; CARIOTO, L.; HAREL, J. Serologic and urinary PCR survey of leptospirosis in healthy cats and in cats with kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 2, p. 284–293, 2014.

SCHULLER, S.; FRANCEY, T.; HARTMANN, K.; HUGONNARD, M.; KOHN, B.; NALLY, J. E.; SYKES, J. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 3, p. 159–179, 2015.

SHOPHET, R.; MARSHALL, R. B. An experimentally induced predator chain transmission of *Leptospira ballum* from mice to cats. **British Veterinary Journal**, v. 3, p. 265–270, 1980.

SONJA, O.; SONJA, R.; NATAŠA, S.; DANICA, B.; SLOBODANKA, V.; MIROSLAV, V. Seroprevalence of Cat Leptospirosis in Belgrade (Serbia). **Acta Veterinaria**, v. 64, n. 4, p. 510–518, 2014.

WEIS, S.; RETTINGER, A.; BERGMANN, M.; LLEWELLYN, J. R.; PANTCHEV, N.; STRAUBINGER, R. K.; HARTMANN, K. Detection of *Leptospira* DNA in urine and presence of specific antibodies in outdoor cats in Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, 2016.

ANEXO 1 – Questionário aplicado aos responsáveis pelos animais

Nome: _____ Idade: _____ Sexo: _____

Responsável: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Número de contactantes: _____ cães _____ gatos _____ outros (_____)

1. Foi utilizada alguma medicação no animal no último ano?

() Sim

Qual? _____

Quanto tempo? _____

Por que? _____

() Não

2. Possui histórico de outras doenças?

() Sim () Não

Qual (is)? _____

3. Apresenta Poliúria?

() Sim () Não

4. Apresenta Polidipsia?

() Sim () Não

5. Apresenta algum outro sinal clínico no momento?

() Sim () Não

Qual? _____

6. Em qual ambiente vive seu animal?

() Casa - com acesso ao ambiente externo

() Casa - sem acesso ao ambiente externo

() Apartamento - sem acesso ao ambiente externo

() Apartamento - com acesso ao ambiente externo

7. Qual a origem do seu animal?

() Comprado de gatil comercial

() ONG

() Da rua

() Ganhou de alguém/ Não sabe a origem

() Outros: _____

-> Adotado/comprado há quanto tempo?

8. O animal tem hábito de caça? (lagartixas, borboletas, passarinhos...)

() Sim () Não

9. Já viu ou sabe se existem ratos próximo a sua casa?

() Sim.

Realiza algum tipo de controle de roedores em sua propriedade?

☐ Não

10. O animal pode ter tido contato com rato ou algum outro tipo de roedor na sua casa ou bairro recentemente?

☐ Sim - Há quanto tempo?

☐ Não

11. O animal pode ter tido contato com animais silvestres ou de produção recentemente?

☐ Sim. Há quanto tempo e qual animal?

☐ Não

12. Existe a possibilidade da comida e/ou a água fornecida ao seu gato ter contato com roedores durante o dia e/ou à noite?

☐ Sim ☐ Não -> Onde ficam os potes e a comida? _____

13. A ração é comprada de saco fechado ou a granel?

☐ Saco fechado ☐ A granel ☐ Usa somente comida caseira

14. Os demais animais de sua propriedade têm contato entre si?

☐ Sim ☐ Não

15. Algum outro animal ficou doente ou apresentou algum outro sinal clínico?

☐ Sim ☐ Não

Qual animal? _____

Qual sinal? _____

16. Algum outro animal contactante morreu no último ano? Qual o motivo?

17. Como é o manejo de urina do gato

- Onde urina? _____

- Frequência de limpeza _____

- Forma de limpeza _____

18. Algum morador da residência (cuidador) apresentou ou tem apresentado sintomas como dor de cabeça, febre, tosse, espirros, vômito, diarreia, dores musculares, tremores e/ou pele e mucosas amareladas recentemente?

☐ Sim ☐ Não - Quais sinais?

☐ Alguém já foi diagnosticado com lepto na residência ?

19. Na região da sua casa a prefeitura já instalou rede de esgoto?
(Saneamento básico?)

() Sim () Não -> há quanto tempo? _____

20. Há rios próximos ou ocorre alagamento com frequência na sua região?

() Sim () Não -> Com que frequência? _____

21. A sua região é considerada área rural ou urbana?

() Rural () Urbana